

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Geräte

Ausgießstation	Tissue Tek® Dispensing console, Sakura
Brutschränke	HeraCell 150, Heraeus, CO <sub>2</sub> Water-Jacketed Incubator, Nuaire Thermo life
Cell Harvester	LKB Wallace
Controller	LKB GP-10, Pharmacia
Coulter Counter	Coulter Ac.T diff, Beckmann Coulter
Durchflusszytometer	FACSCalibur, Beckton Dickinson, DAKOCytomation MoFlo cell sorter
Endoskop Image One 222000 20	Karl Storz GmbH, Tutlingen
Einbettstation	Hypercenter XP, Thermo, Strandon
Eindeckstation	Tissue Tek® SCA, Sakura
Einstabmesskette	pH/Pt 1000 Elektrode SE 100
ELISA-Reader	TECAN Spectra Mini AP
Färbestation	Varistain 24-4, Strandon
Feinwaage	Sartorius
Fraktionssammler	UNO II, Whatmann Biometra
Gelelektrophoresekammer	Biorad
Heizblock	Eppendorf
Inkubator	US Autoflow, NUAIRE™
Liquid-Szintillation-Zähler (Beat plate®)	LKB Wallace
Mikroskop	Zeiss

Mikrotom	HM 330, Microm
Mikrowellengerät	Tec 5096
Netzgerät Electrophoresis Power	Pharmacia
Neubauer Zählkammer	HBG
Peristaltische Pumpe	Peristaltic Pump P-1, Pharmacia
pH-Meter	PH-Meter 766 Calimatic
Photometer (Chromatographie)	2238 UVICORD SII, Pharmacia
Photometer	Ultrospec 1100 pro, Amersham Pharmacia
Pipetten	Eppendorf
Schreiber	BIOSTATOR <sup>®</sup> Recorder-A, Miles
Sterile Werkbank	NU-440-600 E; NUAIRE <sup>™</sup>
Thermocycler	UNO II, Biometra
Vortex VF2	Janke & Kunkel Labortechnik
Waagen	BP 1200, Sartorius
Wasserbad	Köttermann, Uetze/Hänigsen
Zentrifugen	Megafuge 1.0 R, Heraeus, Centrifuge 5804R, Eppendorf, Biofuge Fresco, Heraeus, Biofuge Pico Heraeus

### 3.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Amersham Biosciences	[6- <sup>3</sup> H]-Thymidin (5,0 Ci/mmol); Percoll; Protein A Sepharose CL-4B; Protein G HiTrap
Beckmann Coulter GmbH	AcT Pak; AcT Rinse; AcT 4C ES Kontrolle
Biochrom KG	Amphotericin B; Gentamycin, Biocoll Separation Solution
BD Biosciences	FACS-Flow
Merck	Giemsa-Färbelösung
Biorad	Protein Assay Dye Reagent Concentrate

Biozol	Low-toxicity rabbit complement
Calbiochem	Biotinamidocaproate-N-Hydroxysuccinimidester (Biotin-X-NHS); Kollagenase Typ II (4000 U/L); DNase (225.000.000 U); Ionomycin
Cedarlane	Lympholyte M
Dako	Peroxidase-anti-Peroxidase (PAP), Schweineserum, Schweine-anti-Kaninchen-Immunglobulin
Diagnostica	HemoCARE (Schnelltest auf okkultes Blut im Stuhl)
Fluka	Carboxy-Fluorescein-Diacetat-Succinimidylester (CFSE); Dinatriumhydrogenphosphat; Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> ); Natrium-hydrogenphosphat; Trypanblau; Wasserstoffperoxid (35%)
Invitrogen	DNA-Leiter, 50 bp; DNA-Leiter, 100 bp; Harnstoff; HBSS; HEPES-Puffer; Magnesiumchlorid (50 mM); PCR-Puffer (10x, ohne Mg); TBE-Puffer (10x)
ICN	Schafserythrozyten
Merck	Agarose; Ammoniumchlorid; Borsäure; Isopropanol; Natriumcarbonat; Natriumchlorid; Natriumhydrogensulfat; Natriumhydroxid; Salzsäure (25%); Salzsäure (36%)
PAA	PBS-Dulbecco (1x) w/o Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> ; PBS-Dulbecco (10x) w/o Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> ; RPMI 1640 mit Glutamin; DMEM/HAM's F12, Penicillin; Streptomycin, Trypsin/ EDTA (1x)
Roth	dNTP's (10 mM); Formalin (37%), Natriumhypochlorid (12%); Trisma Ultra
Sakura	O.C.T. Compound Tissue-Tek
SIGMA	2-Aminoethylisothiuronium-Bromid (AET), Brefeldin A; β-Mercaptoethanol; Concalavin A; Diaminbenzidin (DAB), Dithiothreitol (DTT); Di-Kaliumhydrogenphosphat; DMSO (99%); Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA); Ethidiumbromid; Fluorescein-Isothioyanat (FITC); IL-2 (human, recombinant), Kaliumdihydrogenphosphat; Kaliumhydrogencarbonat; Natriumcitrat; ortho-Phenyldiamin (ONPD); Paraformaldehyd; Rinderserumalbumin (BSA); Saccharose; Sephadex G-50; taq-Polymerase; Tween 20; Zitronensäure
Serva	Saponin
VWR	Mitomycin C

### 3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Es wurden Einwegmaterialien der Firmen Nunc, Falcon, Eppendorf, Brand, BD Bioscience und Milteny Biotec (MS-, LS-, LD-Separations-Säulen) verwendet.

### 3.1.4 Antikörper und Hybridome

#### Humane anti-CD2 Antikörper:

Bezeichnung	Isotyp	Bindungs- epitop	Blockiert Erosettierung	Referenz
35.1	IgG <sub>2a</sub>	T11 <sub>2</sub>	nein	108
1E7E8.G4 (UMCD2)	IgG <sub>2a</sub>	T11 <sub>1</sub>	ja	88
3PT	IgG <sub>1</sub>	T11 <sub>1</sub>	ja (nv)	
AICD2M1 (1H10)	IgG <sub>1</sub>	Domäne 2	nein	109
AICD2M2 (7D3)	IgG <sub>1</sub>	T11 <sub>2</sub>	nein	109
AICD2.6 (11F1)	IgG <sub>1</sub>		(nb)	(nb)
AICD2.M3 (10F8)	IgG <sub>1</sub>	T11 <sub>2</sub>	nein	110
CB.219	IgG <sub>2b</sub>	T11 <sub>1</sub>	ja	111
GT2	IgG <sub>1</sub>	T11 <sub>2</sub>	ja	112
ICRFCD2.1.1a (8E5)	IgG <sub>2a</sub>	T11 <sub>1</sub>	ja	110
ICRFCD2.3 (2G9)	IgG <sub>1</sub>	T11 <sub>1</sub>	ja	110
ICRFCD2.7 (E7A10)	IgG <sub>2a</sub>	T11 <sub>1</sub>	(nb)	(nb)
ICRFCD2.9 (1C11)	IgG <sub>2a</sub>	T11 <sub>1</sub>	(nb)	(nb)
OKT11	IgG <sub>1</sub>	T11 <sub>1</sub>	ja	113
TS2/18	IgG <sub>1</sub>	T11 <sub>1</sub>	ja	114
VIT13	IgM	T11 <sub>3</sub>	nein	115
YTH 655.5	IgG <sub>2b</sub>	T11 <sub>3</sub>	nein	116

(nv): nicht veröffentlicht

(nb): nicht bekannt

Im nachfolgenden Text werden jeweils die in Klammern stehenden, inoffiziellen Namen der Antikörper verwendet werden.

**Weitere Antikörper:**

Rezeptor	Bezeichnung	Isotyp	Herkunft	Hybridom
CD2 (Maus)	12-15	IgG <sub>1</sub>	P. Altevogt, Heidelberg	x
CD3 (Human)	OKT3	IgG <sub>2a</sub>	ATCC	x
CD3 (Maus)	145-2C11	IgG <sub>1</sub>	ATCC	x
CD8 (Maus)	53.6-7	IgG <sub>2a</sub>	ATCC	x
CD28 (Human)	BW828	IgG <sub>2a</sub>	Behringwerke AG	
CD28 (Maus)	37.51	IgG <sub>2</sub>	DPC Biermann	
Ratten-Kontroll-IgG			BD Pharmingen	

**3.1.5 Antikörper für die Durchflusszytometrie**

anti-human CD2 FITC, anti-human CD4 (RPA-T4-FITC); anti-human CD25 (PC61-Cy5.5); anti-human CD152 (BN13-APC); anti-human IFN- $\gamma$ (B27-APC); anti-human IL-2 (MQ1-17H12); anti-human IL-4 (MP4-25D2-APC); anti-Human IL-10 (JES3-19F1-APC); anti-Maus CD3 (145-2C11-FITC); anti-Maus CD4 (GK1.5-FITC; GK1.5-PE); anti-Maus CD8a (53-6.7-Biotin); anti-Maus CD25 (7D4-FITC); anti-Maus CD103 (M290-PE); anti-Maus IFN- $\gamma$ (XMG1.2-FITC), anti-Maus IL-2 (JES6-5H4-FITC); anti-Maus IL-10 (JES5-16E3-FITC); Streptavidin-Horseradish Peroxidase (FITC, PE);	BD Biosciences
Maus-IgG <sub>1</sub> (FITC, PE, APC), Maus-IgG <sub>2a</sub> APC, Maus-IgG <sub>2b</sub> R-PE, CD4-FITC, CD45RB-RPE	Caltag
Hamster IgG	Dianova
Ziege-anti-Maus IgG-FITC (GAM-FITC); Streptavidin-FITC; Streptavidin-RPE;	DAKO Diagnostics
Kaninchen-anti-Ratte (FITC)	DPC Biermann
CD58 PE	Immunotech
CD4 (L3T4) MicroBeads; human CD4-Negativ-Selektion, Pan T Cell Isolation Kit; Streptavidin-Beads, anti-Biotin-Microbeads	Miltenyi Biotec
Ziege-anti-Maus IgG-HRP (GAM-HRP)	Pierce

### 3.1.6 Reagenzien zur Zytokinmessung

anti-Maus IL-2; anti-Maus IL-2 biotinyliert; rekombinantes Maus IL-2 OPTIA-Sets: Maus: IL-2; IL-6; IFN- $\gamma$ ; TNF- $\alpha$ ; TGF- $\beta$ Human: IL-2; IL-10; IFN- $\gamma$ ; TGF- $\beta$	BD Bioscience
TGF- $\beta$ E <sub>max</sub> <sup>®</sup> Immuno Assay System	Promega
anti-Maus IL-4 (Capture-, Detektionsantikörper, Standard); anti-Maus IL-10 (Capture-, Detektionsantikörper, Standard)	R&D Systems

### 3.1.7 Häufig verwendete Lösungen und Puffer

AET-Lösung	0,5 g AET auf 12,5 ml A. dest., pH 9; steril
40% Percoll	40% Percoll-Stammlösung in PBS (1x)
44% Percoll	44% Percoll-Stammlösung in PBS (1x)
67,5% Percoll	67,5% Percoll-Stammlösung in PBS (1x)
Bindungspuffer (Protein A)	1,5 M Natriumchlorid (NaCl), 0,75 M Glycin, 0,1% NaN <sub>3</sub>
Bindungspuffer (Protein G)	20 mM Kaliumphosphat, pH 7,0
Blocking Buffer (ELISA)	3% BSA in PBS
Bradfordlösung	1:5 Protein Assay Dye Reagent Concentrate und NaCl
Coating Buffer (ELISA, Proliferation)	Mischen von 0,05 M NaHCO <sub>3</sub> und 0,05 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> bis pH 9,5 erreicht ist; sterilfiltrieren
Coating Buffer (TNF- $\alpha$ -ELISA)	0,1 M Natriumphosphat, pH 6,0
Elutionspuffer (Protein G)	0,1 M Glycin-HCl, pH 2,7
Elutionspuffer A (Protein A)	0,1 M Zitronensäure, pH 2,0
Elutionspuffer B (Protein A)	0,1 M Natriumcitrat, pH 8,9
FACS-Puffer	PBS, 0,5% BSA, 0,1% NaN <sub>3</sub>
HEPES-Bicarbonatpuffer	21 g/L NaHCO <sub>3</sub> , 100 mM HEPES, pH 7,2, sterilfiltriert
Lysepuffer (sterilfiltrieren)	8,9 g/L NH <sub>4</sub> Cl, 1 g/L KHCO <sub>3</sub> , 0,038 g/L EDTA, pH 7,3,
MACS-Markierungs-Puffer	2mM EDTA in PBS (1x)
MACS-Seperations-Puffer	0,5% BSA, 2mM EDTA in PBS (1x)
mPBS-Stammlösung	150,4 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3H <sub>2</sub> O, 26 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O, 800 ml Aqua dest.

mPBS Gebrauchslösung	20 ml mPBS Stammlösung, 480 ml A. dest., (pH 7,4)
Percoll-Stammlösung	90% Percoll, 10% PBS (10x)
Phosphatpuffer (PBS)	5,7 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>5</sub> , 2,45 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> auf 5 l Aqua dest.
Spüllösung (Protein A)	PBS, 0,1% NaN <sub>3</sub>

### 3.1.8 Medien

CMF	100 mL HBSS (w/o Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> ), 100 mL HEPES-Bicarbonatpuffer (10x), 20 mL Fetales Kälberserum (FCS) 5% (30 min bei 56°C hitzeinaktiviert) ad 1 L aqua dest., sterilfiltriert
CMF-DTT	92 mL CMF, 8 mL FCS 5% (30 min bei 56°C hitzeinaktiviert), 15,4 mg DTT, sterilfiltriert
Cytotoxizitätsmedium	0,3 % BSA, 25 mM HEPES-Puffer in 200 mL PBS (1x), sterilfiltriert
Einfriermix	200 µL DMSO, 600 µL FCS (30 min bei 56°C hitzeinaktiviert), 200 µL Kompletmedium (KM)
HBSS-CMF	5 mM EDTA; 0,02% DTT in HBSS (w/o Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> )
Kollagenase-Medium	20 mL KM, 20 mg Kollagenase Typ II, 400 µg DNase I
Kompletmedium (L-Zelllinien)	FCS 10% (30 min bei 56°C hitzeinaktiviert), Penicillin (10 <sup>5</sup> U/L), Streptomycin (10 <sup>5</sup> µg/L), Glutamin (3 mM) in DMEM/HAM's F12 mit Glutamin
Kompletmedium (Mauszellen)	FCS 10% (30 min bei 56°C hitzeinaktiviert), Penicillin (10 <sup>5</sup> U/L), Streptomycin (10 <sup>5</sup> µg/L), Glutamin (3 mM) in RPMI 1640 mit Glutamax + 50 µM β-Mercaptoethanol
Medium A	HBSS, 0,05 mM β-ME, Pen/Strep 0,05mg/ml, 2,5
Medium B	KM, 2,5
serumfreies Medium	RPMI 1640 + Penicillin (10 <sup>5</sup> U/L), Streptomycin (10 <sup>5</sup> µg/L), Glutamin (4 mM)
Waschmedium (5%)	FCS 5% (30 min bei 56°C hitzeinaktiviert), 0,05 mM β-Mercaptoethanol in RPMI 1640 mit Glutamax

### 3.1.9 Mäuse

BALB/c	M&B A/S, FEM, Berlin; Harlan, Deutschland
C57BL/6	FEM, Berlin; BgVV, Berlin
CD2 human transgen (C57BL/6) <sup>117</sup>	Prof. Kiossis, MRC Molecular Immunology, London, UK
CD2 defizient (B6.129S2-Cd2 <sup>tm1</sup> N5) <sup>118</sup>	Taconic, NY, USA
CB1.7-SCID	Charles River, Deutschland
Rag1 defizient (C57BL/6J-Rag1 <sup>tm1Mom</sup> )	The Jackson Lab, Maine, USA
Rag2 defizient (B6.S129 <sup>IM1</sup> N12)	Taconic, NY, USA

Die Mäuse wurden unter SPF-Bedingungen im FEM (Berlin) bei freiem Zugang zu Futter und Wasser gezüchtet. Die Blutabnahme erfolgte entweder retrobulbär oder aus der Schwanzvene. Der Zustand von Mäusen, die sich im Versuch befanden, wurde mindestens 3 x wöchentlich klinisch begutachtet (Gewichtsverlust, Rektumprolaps, Diarrhöe, Hämokkult, struppiges Fell bzw. sonstige Auffälligkeiten). Teilweise fand eine Coloskopie der Tiere zur Beurteilung der Schwere der Colitis statt.

Zur Erstellung von (Differential-)Blutbildern (mittels eines automatischen Zytometers) wurden Blutproben der Tiere entnommen und Blutausrichungen angefertigt. Die Blutentnahmen erfolgten i.d.R. vor und während des Versuches aus der Schwanzvene bzw. retrobulbär und nach Versuchsende aus dem Herzen des Tieres. Die Tötung erfolgte mittels CO<sub>2</sub>-Inhalation oder zervikaler Dislokation am Versuchsende bzw. bei einem Gewichtsverlust von > 20% und/oder offensichtlichen Zeichen von Schmerz und/oder Lethargie.



### 3.1.10 Zelllinien

Neben verschiedenen, monoklonale Antikörper produzierenden Hybridomen (siehe dazu 3.1.4 Antikörper und Hybridome) standen uns transfizierte L-Zellen zur Verfügung. Diese L-Zelllinien (Maus-Fibroblasten), die entweder stabil humanes CD58, oder humanes CD58/CD80 exprimierten, wurden uns freundlicherweise von H. Groux (Frankreich) zur Verfügung gestellt. Setzt man die CD58-transfizierten Zellen als Kostimulator von PBL ein, führen diese zur Induktion von T-Zellen mit regulatorischem Phänotyp<sup>65</sup>. Diese Zelllinien dienten als Kontrollen zu *in vitro*-Versuchen mit humanen bzw. human CD2 transgenen Zellen.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellisolation

Die Versuchstiere wurden nach Versuchsende durch zervikale Dislokation oder mittels Asphyxie in CO<sub>2</sub>-Atmosphäre getötet. Anschließend wurden Lymphozyten aus den mesenterialen Lymphknoten, Milz und Colon isoliert. Des Weiteren wurden den Mäusen Darmstücke für histologische Untersuchungen entnommen.

Periphere Blutlymphozyten sowie CD4 positive T-Zellen wurden aus dem Blut freiwilliger Spender isoliert und Lymphozyten der Lamina propria wurden aus nicht-entzündlichen Bereichen von Resektaten gewonnen.

#### 3.2.1.1 *Splenozyten*

Die Milzen wurden zur Zellvereinzellung zerrieben und durch ein Zellsieb (70 µm Maschenweite) gegeben. Es wurde mit mindestens 30 ml serumfreiem Medium nachgespült. Die Zellen wurden abzentrifugiert (300 g, 10 min, RT) und in 5% Waschmedium resuspendiert. Die Lyse der Erythrozyten erfolgte durch eine 5-minütige Inkubation in Lysepuffer. Das Pellet wurde erneut gewaschen und die Splenozyten in KM aufgenommen.

#### 3.2.1.2 *Lymphozyten der mesenterialen Lymphknoten*

Mesenteriale Lymphknoten (mLK) wurden mit der Rückseite eines Spritzenkolbens in einer sterilen Petrischale zerrieben. Die Suspension wurde durch ein Zellsieb gegeben und es wurde mit 5% Waschmedium nachgespült. Nach Zentrifugation (300 g, 10 min, RT) wurden die Zellen erneut gewaschen und in Kompletmedium aufgenommen.

### 3.2.1.3 *Murine Lamina propria Lymphozyten*

Das Colon wurde nach der Entnahme aus der Maus von Faeces und Fett befreit, längs aufgeschnitten, in 0,5 cm große Stücke geschnitten und in HBSS-CMF+DTT+EDTA schüttelnd inkubiert, um die Epithelschicht aufzulösen. Während der 45-minütigen Inkubationszeit wurde das Medium zweimal gewechselt. Um das Gewebe zu verdauen wurden die Darmstücke nach Zentrifugation in Kollagenase-Medium aufgenommen und 90 min schüttelnd inkubiert. Die entstandene Zellsuspension wurde durch ein Zellsieb gegeben, mit 5% Waschmedium gewaschen und in einem Percoll-Dichtegradienten zentrifugiert (100% / 40%; 900 g, 25 min ohne Bremse). Die Lamina propria Lymphozyten (LPL) wurden aus der Interphase entnommen, abzentrifugiert (10 min, 600 g), zweimal gewaschen und in Kompletmedium aufgenommen.

### 3.2.1.4 *Humane Lymphozyten der Lamina propria*

Zur Gewinnung humaner LPL wurden die Resektate nach der Entnahme in sterilem, gekühltem PBS gewaschen, von Fett befreit, aufgespannt und die Muskularis wurde mit Hilfe von zwei Objektträgern von der Mukosa entfernt. Nach 15 minütiger Inkubation (Schüttler) mit Medium A + DTT wurde die Mukosa 3 x in Medium A gewaschen, und anschließend für 30 min in 30 ml Medium A + 120 µl 0,5 M EDTA geschüttelt (RT). Um das Gewebe zu verdauen, wurden 20 ml Medium B mit 400 µg DNase I, sowie mit 20 mg Kollagenase versetzt, und das Gewebe darin unter Schütteln verdaut (etwa 60-90 min). Um eine homogene Suspension zu erhalten, wurde die Lösung mehrfach in eine 20 ml-Spritze Kanüle gezogen und anschließend durch ein Zellsieb in ein 50 ml Tube überführt. Nach zweimaligem Waschen (300 g, 10 min) wurde das Pellet mit 30 ml Medium B und 15 ml 100% Percoll resuspendiert und 12 min bei 600 g abzentrifugiert. Abschließend wurden die gewonnenen LPLs zweimal gewaschen und gezählt. Die Ausbeute an lebenden Zellen war größer als 90%.

### 3.2.1.5 *Periphere Blut-Lymphozyten*

Zur Gewinnung von peripheren Lymphozyten (PBL) wurde heparinisiertes Blut abzentrifugiert (20 min, 720 g), das Serum abgenommen, das Pellet mit 10 ml RPMI gemixt und mit 15 ml Biocoll unterschichtet. Durch die anschließende Differentialzentrifugation (20 min, 1100 g, keine Bremse, RT) wurden die Lymphozyten gewonnen. Vor der Weiterverarbeitung der PBL erfolgten zwei Waschschriffe (10 min, 260 g, RT).

### 3.2.1.6 *CD4 positive T-Zellen*

CD4 positive (CD4<sup>+</sup>) T-Zellen wurden entweder über E-Rosettierung (Versuche zur Proliferationshemmung), über MACS-Negativselektion (Versuche zur Induktion von regulatorischen T-Zellen) oder über MACS-Positivselektion (Isolation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen für die Transfercolitis) gewonnen.

Bei der E-Rosettierung erfolgte in einem ersten Schritt die Depletion der Monozyten (2 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml, Endvolumen 50 ml, 37°C) durch Adhäsion (1 Std., 37°C), in einem zweiten Schritt wurden die T-Zellen isoliert. Für den zweiten Schritt mussten die Schaferythrozyten wie folgt präpariert werden: 2 ml der Erythrozyten wurden zweimal gewaschen (PBS, 10 min, 270 g), und mit 10 ml AET-Lösung im Wasserbad (37°C, 10 min) inkubiert. Im zweiten Schritt wurden dann zu 1 x 10<sup>6</sup> der Monozyten-depletierten Zellen je 30 µl der zuvor hergestellten 5%igen AET-Schaferythrozyten-Suspension gegeben. Die Probe wurde mit Waschmedium auf 10 ml aufgefüllt, abzentrifugiert (5 min, 70 g) und 60 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen vorsichtig resuspendiert, mit 13 ml Biocoll unterschichtet und zentrifugiert (20 min, 190 g, ungebremst; 10 min, 750 g, ungebremst). Das Pellet wurde aufgenommen, die Erythrozyten lysiert, und die gewonnenen CD4<sup>+</sup> Zellen abschließend zweimal gewaschen (10 min, 270g).

Das Prinzip der Auftrennung über Microbeads beruht auf der Inkubation der Zellsuspension mit Antikörpern, welche an magnetische Beads gekoppelt sind, und mit Hilfe eines Magneten aus der Suspension separiert werden.

Die Aufreinigung über MACS-Microbeads (LS MACS separations columns, Miltenyi Biotec) erfolgte als Negativ-Separation nach Angaben des Herstellers: Hierzu wurden 10<sup>7</sup> PBL in 40 µl MACS-Separations-Puffer resuspendiert und für 10 min bei 4-8°C mit

10 µl des biotinylierten Antikörper-Cocktails inkubiert. Nach Zugabe von 30 µl Puffer und 20 µl Anti-Biotin-Microbeads wurden die Zellen für weitere 15 min bei 4-8 °C inkubiert, mit dem 10-20 fachen Volumen Puffer gewaschen und in 500 µl Puffer aufgenommen. Die Zellen wurden auf die magnetische Säule aufgetragen und die unmarkierten (nicht magnetischen) CD4<sup>+</sup> Zellen wurden aufgefangen und weiter verwendet.

Die CD4-Positivselektion erfolgte ebenfalls den Angaben des Herstellers (Miltenyi Biotec) entsprechend. Hierzu wurden 10<sup>7</sup> PBL in 90 µl MACS-Separations-Puffer resuspendiert, für 15 min bei 4-8°C mit 10 µl CD4 MicroBeads inkubiert, mit dem 10-20 fachen Volumen Puffer gewaschen und in 500 µl Puffer aufgenommen. Die Zellen wurden auf die magnetische Säule aufgetragen. Die unmarkierten (nicht magnetischen) Zellen wurden von der Säule gespült und die CD4<sup>+</sup> magnetischen Zellen wurden aufgefangen und weiter verwendet.

## **3.2.2 Zellkultur und Antikörperaufreinigung**

### **3.2.2.1 Zellkultur**

#### **3.2.2.1.1 Kultivierung und Stimulation von Zellen**

Suspensionskulturen wurden in Abhängigkeit von ihrer Proliferationsrate mit neuem Medium versorgt. Beim Wechseln der Medien wurden die Zellen zentrifugiert (300 g, 5 min, RT) und anschließend in frischem, 37°C-warmem Medium aufgenommen. Adhärenente Monolayer-Zellkulturen wurden ebenfalls in Abhängigkeit von ihrer Proliferationsrate mit neuem Medium versorgt bzw. passagiert. Zu dicht gewachsene Zellen wurden mit Trypsin/EDTA (1x) abgelöst, gewaschen (300 g, 5 min, RT) und in frischem Medium resuspendiert.

Isolierte Zellen (mLK, Splenozyten, LPL, PBL, gereinigte T-Zellen) wurden für die Bestimmung von Zytokinen im Überstand sowie zur Messung der Proliferation über den <sup>3</sup>H-Thymidintest mit einer Dichte von 1 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml eingesät. CFSE-markierte Zellen wurden mit einer Dichte von 2 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml kultiviert.

Soweit nicht anders beschrieben wurden isolierte Zellen über anti-CD3 (10 µg/ml gecoatet) und anti-CD28 mAk (1 µg/ml löslich) stimuliert.

Alle Zellkulturen wurden in einem mit 6% CO<sub>2</sub> begasten Feuchtbrutschrank bei 37°C inkubiert. Als Kulturgefäße dienten Zellkultur-Kunststoffflaschen.

#### **3.2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Zum Einfrieren wurden Zellen verwendet, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden.  $5 \times 10^6$  Zellen wurden zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden resuspendiert, in eiskaltem Medium (350 µl) aufgenommen, in ein Einfrierröhrchen überführt und anschließend wurde eiskalter, doppelt-konzentrierter Einfriermix (500 µl) tropfenweise zugegeben. Die Einfrier-röhrchen wurden umgehend bei -80°C eingefroren und später unter Flüssigstickstoff gelagert. Tiefgefrorene Zellen wurden in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in 5 ml Medium aufgenommen.

Kryokonservierte Zellen wurden bei 37°C kurz aufgetaut, in vorgewärmtes Medium überführt und zentrifugiert. Nach Zellzählung wurden  $1 \times 10^5$  Zellen/mL in Kulturflaschen oder Mikrotiterplatten eingesät.

#### **3.2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl**

Zur Bestimmung der Zahl lebender Zellen wurden die Zellsuspensionen mit Trypanblau (0,5%) 1:2 verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer (Tiefe 0,1 mm;  $0,0025 \text{ mm}^2$ ) lichtmikroskopisch ausgezählt.

#### **3.2.2.1.4 Colonkultur**

Vom Ileum mit *Toxoplasma gondii* infizierter Mäuse wurden Colonkulturen angelegt. Hierfür wurde circa 1 cm gereinigter, aufgeschnittener Darm in 1 ml serumfreiem Medium über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und weg-gefroren, um zu einem späteren Zeitpunkt die Zytokine darin zu bestimmen.

Von dem Überstand wurde außerdem das Gesamtprotein bestimmt (modifiziert nach Bradford). Die Zytokinkonzentrationen wurden auf ng/mg Protein umgerechnet.

### **3.2.2.1.5 Mitomycin-Behandlung**

Um Zellen zu generieren, die der Präsentation von Oberflächen-Rezeptoren dienen, selbst jedoch nicht proliferierten, wurden die Zellen mit Mitomycin C inaktiviert. Mitomycin C wird aus *Streptomyces caespitosus* gewonnen und ist ein zytostatisches Reagenz, aus der Gruppe der Antibiotika. Seine Wirkung entfaltet es über Alkylierung und Crosslinking von DNA und unterbindet auf diesem Weg die Proliferation.

Zur Inaktivierung wurden  $1 \times 10^6$  Zellen mit 40  $\mu$ l Mitomycin (1mg/ml; 20 min, RT) inkubiert, zweimal gewaschen und als kostimulatorisch wirksame „Bystander-Zellen“ in einer Konzentration von  $1 \times 10^5$ /ml eingesetzt.

### **3.2.2.2 Antikörperaufreinigung**

Monoklonale Antikörper aus Hybridomzellüberständen wurden mittels Affinitätschromatographie über Protein A- oder Protein G-Sepharose gewonnen. Protein A und G sind bakterielle Proteine mit hoher Affinität zum Fc-Teil einiger IgG-Isotypen (Protein A: IgG<sub>1, 2a und 2b</sub>, Protein G: IgG<sub>1, 2a, 2b und 3</sub>). Die Bindungsaffinität des Fc-Teils zu Protein A oder G nimmt mit sinkendem pH ab, d.h. gebundene Antikörper werden mit sinkendem pH eluiert.

Für die Aufreinigung über Protein A-Sepharose wurden der Überstand mit 56,3 g/l Glycin und 87,7 g/l NaCl versetzt und der pH-Wert mittels 10 M NaOH auf 8,9 eingestellt. Der so vorbehandelte und sterilfiltrierte Überstand wurde mit einem Volumenstrom von 1 ml/min über Nacht über die aquilibrierte Säule geführt. Die Elution der Antikörper erfolgte mittels verschiedener pH-Werte (IgG<sub>1</sub>: pH 6,0 (89% Elutionspuffer), IgG<sub>2a</sub>: pH 4,5 (56% Elutionspuffer), IgG<sub>2b</sub>: pH 3,5 (26% Elutionspuffer)). Die Änderung der Absorption des Eluats wurde bei 280 nm gemessen, die gewünschten Fraktionen wurden gepoolt, neutralisiert und unter Vakuum eingeeengt. Anschließend wurde die Suspension über 24 Stunden gegen PBS dialysiert. Währenddessen wurde das PBS zweimal gewechselt. Die Proteinkonzentration wurde fotometrisch bestimmt und wie folgt berechnet:  $A_{280} = 1,4 = 1 \text{ mg/ml}$ .

Zur Aufreinigung über Protein G-Sepharose wurde der Hybridomüberstand mit 1M NaOH auf pH 7,0 eingestellt und sterilfiltriert (0,45  $\mu$ m Nalgene). Die Säule wurde mit 10 Säulenvolumen Bindungspuffer aquilibriert und der vorbehandelte Überstand wurde

über die Säule geführt. Anschließend wurde die Säule an ein Fotometer (280 nm) angeschlossen, mit ca. 10 Säulenvolumen Bindungspuffer gewaschen und anschließend mit Elutionspuffer (pH 2,7) eluiert. In die Sammelröhrchen wurde Tris-HCl (pH 9) vorgelegt, um säurelabile Antikörper umgehend zu neutralisieren. Die erwünschten Fraktionen wurden zusammengeführt und unter Vakuum eingengt. Anschließend wurde die Suspension ebenfalls über 24 Stunden gegen PBS dialysiert. Die Proteinkonzentration wurde fotometrisch bestimmt und nach obiger Formel berechnet. Aliquots wurden sterilfiltriert und bei -20°C gelagert.

### **3.2.3 Durchflusszytometrie**

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie werden unter anderem Informationen über Größe und Struktur einzelner Zellen gewonnen. Weiterhin kann auch die Expression von verschiedenen Oberflächenproteinen und intrazellulären Antigenen qualitativ und quantitativ analysiert werden. Wenn eine Zelle den Laserstrahl des Durchflusszytometers passiert, wird Licht je nach Struktur und Größe in verschiedene Richtungen gestreut. Fluoreszenzmoleküle auf bzw. in der Zelle werden angeregt und emittieren daraufhin Licht, dessen Spektrum molekülabhängig ist. Das gestreute und emittierte Licht wird von Detektoren gesammelt, die das Licht in elektrische Signale umwandeln. Je Messung wurden 25.000-100.000 Zellen analysiert. Zur Auswertung der Messdaten wurde die Cellquest Pro Software (Becton Dickinson) genutzt. Tote Zellen wurden durch Nutzung der vorderen und seitlichen Lichtstreuungsparameter, die Aussagen über Größe und Granularität der Zellen zulassen, von der Analyse ausgeschlossen.

#### **3.2.3.1 *Fixieren von Zellen***

Die zu fixierenden Zellen wurden abzentrifugiert (10 min, 200 g), das Pellet resuspendiert und in 1 ml 2% Formalin für 15 min (RT) fixiert. Anschließend wurden die Zellen 2 x gewaschen und in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert. So fixierte Zellen konnten 2-3 Wochen bei 4°C aufbewahrt werden.



### 3.2.3.2 *Färbung von Oberflächenmolekülen*

Die Expression von Oberflächenmolekülen wurde durch Färbung mit spezifischen, fluoreszenzmarkierten Antikörpern und anschließender Messung im Durchflusszytometer (FACScan, Becton Dickinson) bestimmt. Hierfür wurden fixierte oder unfixierte Zellen ( $5 \times 10^5$  Zellen/Ansatz) mit FACS-Puffer gewaschen (400 g/ 5 min/ 4°C) und in einem Färbevolumen von 50 µl mit einem oder mehreren fluoreszenzmarkierten Antikörpern in optimaler Konzentration 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die markierten Zellen wurden gewaschen (400 g/ 5 min/ 4°C), in 300 µl FACS-Puffer aufgenommen und die Oberflächenmoleküle durchflusszytometrisch bestimmt. Unmarkierte Antikörper wurden in einem zweiten Schritt mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundär-Antikörper gegengefärbt (20 min, 4°C) und vor der Analyse zweimal gewaschen (400 g/ 5 min/ 4°C).

### 3.2.3.3 *Intrazelluläre Färbung*

Für die Bestimmung intrazellulärer Zytokine wurden die isolierten Zellen für 3 Tage über CD3 und CD28 (10 µg/ml ge-coated bzw. 1 µg/ml löslich) aktiviert und in den letzten 6 Stunden mit PMA/ Ionomycin (10 µg/ml bzw. 1 µg/ml) restimuliert. Um die Sekretion der Zytokine zu unterbinden, wurde den Kulturen in den letzten 2 Stunden der Restimulation Brefeldin A (inhibiert intrazellulären Protein-Transport) zugesetzt. Anschließend wurden die Zellen geerntet, gewaschen (400 g/ 5 min/ 4°C) und fixiert.

Um die Zellwände für den fluoreszenzmarkierten Antikörper, der gegen ein bestimmtes Zytokin oder gegen ein intrazelluläres Molekül gerichtet ist, durchlässig zu machen (Permeabilisierung), wurden die fixierten Zellen mit dem fluoreszenzmarkierten Antikörper für 20 min in 0,5%-iger Saponinlösung inkubiert. Nach zwei Waschschritten (400 g/ 5 min/ 4°C) wurden die markierten Zellen in 300 µl FACS-Puffer aufgenommen und gemessen.

### 3.2.4 Induktion von Transfercolitis

In dieser Arbeit wurden zwei Modelle der Transfercolitis verwendet: das fulminant verlaufende Modell der durch Concanavalin A (ConA) aktivierten T-Zellblasten induzierten Transfercolitis sowie das klassische CD45RB<sup>high</sup>-Transfercolitismodell, bei dem es zu einer späteren und geringeren Ausprägung der Entzündung kommt.

#### 3.2.4.1 CD4-T-Zellblasten-Transfercolitis

Milzen wurden C57BL/6 Donormäusen entnommen, die Splenozyten wie oben beschrieben isoliert, in einer Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml ausgesät und für 3 Tage mit 5 µg/ml ConA stimuliert.

CD4<sup>+</sup> T-Zellblasten wurden durch Inkubation mit einem anti-CD8 Antikörper (53-6.7; 1 µg/ $10^6$  Zellen, 30 min, 4°C) und Komplementzugabe von CD8<sup>+</sup> T-Zellen depletiert ("low-toxicity rabbit complement", Biozol; 60 min, 37°C) sowie anschließend über magnetische CD4 Microbeads (LS MACS separations columns, Miltenyi Biotec; Durchführung nach Protokoll des Herstellers) positiv selektioniert. Die so isolierten CD4<sup>+</sup> Zellen (Reinheit > 95%) wurden gewaschen und  $3 \times 10^5$  der kongenen CD4<sup>+</sup> Blasten wurden intraperitoneal (i.p.) auf 8-12 Wochen alte Rag1 defiziente Mäuse transferiert. Die Rezipienten entwickelten nach etwa 3 Wochen eine heftige Darmentzündung, die unbehandelt letal verlief.

#### 3.2.4.2 CD45RB<sup>high</sup>-Transfercolitis

Splenozyten von BALB/c-Mäusen wurden wie oben beschrieben isoliert. Anschließend wurden CD4 positive Zellen über MicroBeads ( $10 \mu\text{l}/10^7$  Zellen; Miltenyi Biotec; Durchführung nach Protokoll des Herstellers) aufgereinigt, und mit anti-CD4-FITC ( $1,5 \mu\text{l}/10^7$  Zellen) sowie anti-CD45RB-PE ( $1,5 \mu\text{l}/10^7$  Zellen) markiert. Mit Hilfe eines FACS-Sorters (DAKOCytomation MoFlo cell sorter) wurden jene 30% der Zellen aussortiert, die am stärksten CD45RB exprimierten (CD45RB<sup>high</sup>).

Je  $2 \times 10^5$  dieser CD45RB<sup>high</sup> Zellen wurden i.p. immundefizienten SCID-Mäusen appliziert. Die Mäuse wiesen nach etwa 3 Wochen erste klinische Symptome einer

Colitis (Hämokult positiv) auf und zeigten insgesamt einen milderen Krankheitsverlauf als Tiere, denen CD4-positive ConA-Blasten appliziert wurden.

Zusätzlich zu den weiter oben beschriebenen klinischen Beobachtungen der Tiere wurde in diesem Modell ab der 3. Woche nach Transfer wöchentlich ein Hämokult Test durchgeführt. In der 6. Woche nach Transfer wurden die Mäuse außerdem coloskopiert.

### **3.2.5 Behandlung mit dem anti-CD2 mAk 12-15**

Die Behandlung mit dem anti-CD2 mAk 12-15 wurde doppelt-blind in 4 verschiedenen Behandlungsblöcken durchgeführt. Bei den Untersuchungen zur präventiven Wirkung des Antikörpers wurden initial mit Induktion der Transfercolitis 400 µg und nachfolgend wöchentlich 200 µg anti-CD2 mAk 12-15 (n = 16 für CD4-T-Zellblasten-Transfercolitis bzw. n = 10 für CD45RB<sup>high</sup>-Transfercolitis) bzw. Kontroll-Ak (n = 13 für CD4-T-Zellblasten-Transfercolitis bzw. n = 10 für CD45RB<sup>high</sup>-Transfercolitis) i.p. verabreicht. Dieser Behandlungsblock wurde an zwei verschiedenen Instituten (Homburg bzw. Berlin) sowie mit zwei verschiedenen Colitis-Modellen (CD4-T-Zellblasten bzw. CD45RB<sup>high</sup>) durchgeführt.

Im 3. Behandlungsblock wurden Mäuse mit etablierter CD4-T-Zellblasten-Transfercolitis ohne zusätzlichen Glukokortikoidschub behandelt. Beim Auftreten von ersten Krankheitszeichen (wie z.B. Diarrhöe oder Gewichtsverlust > 5 %) wurde mit der Therapie begonnen. Den Tieren wurden initial 400 µg anti-CD2 mAk 12-15 (n = 9) bzw. Kontroll-Ak (n = 9) und nachfolgend wöchentlich 200 µg der Antikörper appliziert.

Des Weiteren wurde die Behandlung etablierter CD4-T-Zellblasten-Transfercolitis mit einer Kombination aus Antikörper und Dexamethason, einem synthetischen Glukokortikoid, untersucht. Mit der Behandlung begonnen wurde auch hier bei Einsetzen der Colitis. Die Tiere bekamen initial 400 µg des anti-CD2- (n = 8) bzw. Kontroll-Ak (n = 8) in Kombination mit Dexamethason (1 mg/kg Körpergewicht) an Tag 1, Tag 4 und nachfolgend wöchentlich 200 µg der Antikörper ebenfalls kombiniert mit Dexamethason appliziert.

### 3.2.6 Versuche zur Infektabwehr

#### 3.2.6.1 *Infektion mit Toxoplasma gondii und nachfolgende anti-CD2 mAk Behandlung*

Zur Untersuchung des Einflusses einer CD2-gerichteten Immuntherapie wurden weibliche C57BL/6 Mäuse per Schlundsonde mit 100 Zysten (Stamm ME49) *Toxoplasma gondii* infiziert. Insgesamt wurden 23 Mäuse entweder mit Ratten-IgG (Kontrollgruppe, n = 8) oder mit dem anti-CD2-mAk 12-15 (n = 15) behandelt. Initial erhielten die Mäuse 200 µg Antikörper und nachfolgend 100 µg täglich über 7 Tage. An Tag 12 nach Infektion wurden 12 der Tiere (4 Kontroll- und 8 Versuchsmäuse) getötet und die Zahl der Parasiten pro cm Ileum wurde wie bei Liesenfeld et al. beschrieben bestimmt<sup>48</sup>. Von den verbliebenen 11 Mäusen (4 Kontrollen und 7 anti-CD2-behandelte Mäuse) wurde das Überleben aufgezeichnet.

#### 3.2.6.2 *Infektion CD2-defizienter Mäuse mit Toxoplasma gondii*

Zur Untersuchung der Bedeutung von CD2 für eine Infektion mit *Toxoplasma gondii*, wurden homozygot CD2-defiziente (n = 16) und C57BL/6 Wildtyp-Mäuse (n = 10) per Schlundsonde mit *Toxoplasma gondii* infiziert. An Tag 7 wurden die Kontrolltiere sowie 8 der CD2-defizienten Mäuse getötet. Es wurden Blut (zur Serumgewinnung), Milzen und mLK (Zellisolierung) und ein Stück Ileum (Histologie und Colonkultur) entnommen. Die isolierten Lymphozyten wurden über CD3/CD28 bzw. Toxoplasmenlysate (TLA) stimuliert, verschiedene Zytokine (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ) wurden mittels ELISA und die Proliferation wurde über den Einbau von <sup>3</sup>H-Thymidin bestimmt. Von den verbleibenden 8 CD2-defizienten Mäusen wurde eine Kaplan-Meier-Überlebenskurve erstellt. Die Versuche wurden in 3 separaten Ansätzen durchgeführt.

### 3.2.7 Endoskopie

Mäuse, denen CD45RB<sup>high</sup> T-Zellen transferiert wurden, wurden 6 Wochen nach Transfer endoskopiert. Um die Darmentleerung zu fördern, wurde den Mäusen für einige Minuten das Futter entzogen und sie wurden durch Vereinzelung unter Stress

gesetzt. Anschließend wurden die Mäuse zur Fixierung in eine schmale Plastikröhre gesetzt. Zur Beurteilung der Colitis wurde das Endoskop (Karl Storz GmbH) etwa 3 cm in das Rectum eingeführt und die erhaltenen Filmsequenzen wurden zur späteren Analyse durch einen erfahrenen Gastroenterologen auf Video aufgenommen.

### **3.2.8 Depletionsversuche**

Um zum einen depletierende Eigenschaften des anti-CD2 mAk 12-15 als Ursache für einen veränderten Verlauf bei der Transfercolitis auszuschließen und zusätzlich eine mögliche Induktion regulatorischer T-Zellen zu kontrollieren, wurden CFSE-markierte, CD4 positive ConA-Blasten (aus C57Bl/6-Donortieren) auf Rag1 defiziente Mäuse transferiert ( $4 \times 10^6$  Zellen/Maus). Zusätzlich erhielten die Mäuse entweder 400 µg des anti-CD2 mAk 12-15 (Versuch, n = 3), GK1.5 (depletierender anti-CD4 Antikörper, n = 3) oder Ratten-IgG (Kontrolle, n = 3). Nach einem Tag wurden Lymphozyten aus dem peripheren Blut der Mäuse gewonnen, an Tag 3 wurden die Tiere getötet, und Lymphozyten aus dem Blut, der Milz, den mesenterialen Lymphknoten sowie dem Colon isoliert. Die aufgereinigten Zellen wurden mit CD25 und CD103 ( $\alpha E\beta 7$ ) gegengefärbt (Protokoll siehe 3.2.3.2) und durchflusszytometrisch analysiert. Die CFSE-Färbung der transferierten Zellen ermöglichte hierbei sowohl ein „Wiederfinden“ der Zellen als auch eine Beurteilung des Proliferationsverhaltens. Die Färbung auf CD25 und CD103 diente dazu, die Induktion regulatorischer T-Zellen zu überprüfen.

### **3.2.9 Proliferationstest**

#### **3.2.9.1 <sup>3</sup>H-Thymidin-Test**

Proportional zur Proliferation von Zellen erfolgt die DNA-Neusynthese. Der Einbau von Tritium-markierten Desoxythymidin (<sup>3</sup>H-Thymidin) in neusynthetisierte DNA ermöglicht daher die Bestimmung der Zellproliferation über die Messung der eingebauten Radioaktivität. Hierfür wurden hydrophile 96-well Flachbodenplatten teilweise mit anti-CD3-Antikörper (10 µg/mL) beschichtet und die Proliferation von unstimulierten, bzw. mit anti-CD28-Antikörper (1 µg/mL) kostimulierten Lymphozyten der Lamina propria, der Milz oder der mesenterialen Lymphknoten bestimmt. Die Einsaatdichte der Zellen

betrug  $1 \times 10^6$ /ml KM. Die Inkubation erfolgte bei  $37^\circ\text{C}$ , 6%  $\text{CO}_2$  und 95% rel. Luftfeuchtigkeit über 96 Stunden. Nach 80 Stunden wurden die Zellen mit  $^3\text{H}$ -Thymidin-Lösung (0,5  $\mu\text{Ci}$  pro well) gepulst. Der  $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbau in die DNA wurden mittels eines Liquid-Szintillation-Zählers (LKB Wallace) bestimmt. Soweit nicht anders ausgeführt wird das Wachstum als Proliferationsindex (PI = Proliferation stimulierter Zellen/Proliferation unstimulierter Zellen) angegeben.

### 3.2.9.2 CFSE-Markierung

Mit Hilfe der CFSE-Färbung kann durchflusszytometrisch die Teilung von Zellen nachgewiesen werden. CFSE ist ein fluoreszierender Farbstoff, der mit großer Genauigkeit zwischen den Tochterzellen aufgeteilt wird und es dadurch erlaubt, jede neue Generation von Tochterzellen mittels Durchflusszytometrie zu identifizieren<sup>119</sup>. In seiner ursprünglichen Form ist CFSE membran-permeabel und nicht fluoreszierend. Nach Diffusion in die Zelle wird CFSE durch eine nicht-spezifische Esterase gespalten und dadurch so verändert, dass es stark fluoresziert, die Zellmembranen nicht länger durchdringt und für Tage im Zytoplasma der Zelle verbleibt. Proliferiert die Zelle, so wird die Menge an CFSE bei jeder Teilung gleichmäßig in den Tochterzellen verteilt. Dieser Verlust an Fluoreszenzintensität kann durchflusszytometrisch detektiert werden. Zum Markieren wurden  $1 \times 10^7$  Zellen/ml in serumfreien Medium mit 1  $\mu\text{M}$  CFSE für 10 min bei RT inkubiert und zweimal mit serumhaltigem Medium gewaschen. Die Zellen ( $2 \times 10^6$ /ml) wurden mit bzw. ohne Zugabe der potentiell modulierenden anti-CD2 mAk stimuliert, und die Proliferation wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchflusszytometrisch analysiert. Die Proliferation nach Stimulation wurde gleich 100% gesetzt, und die Hemmung der Proliferation bei zusätzlicher Zugabe der verschiedenen anti-CD2 mAk wurde wie folgt bestimmt:

$$\% \text{ Hemmung} = 100 - \left[ \frac{(\text{Proliferation stimulierter Zellen} + \text{CD2 mAk})}{(\text{Proliferation stimulierter Zellen})} \right] \times 100$$

### 3.2.10 Zytokinmessungen (ELISA)

T-Zellen sezernieren nach Stimulation Zytokine, die mittels enzymgekoppeltem Immunsorptionsstest (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) mit hoher Empfindlichkeit und Genauigkeit nachgewiesen werden können. Je nach Fragestellung wurden verschiedene Zytokine (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ ) nach Anleitung des Herstellers nachgewiesen. Prinzipiell wurden für den ELISA unmarkierte anti-Zytokin-Antikörper (Fang-Antikörper) auf Maxi-sorb<sup>®</sup>-Mikrotiterplatten fixiert und freie Bindungsstellen auf dem Kunststoffträger mit Blockpuffer abgesättigt. Die Proben wurden in verschiedenen Verdünnungen aufgetragen. Nach Inkubation (2 Std. RT) wurde nicht gebundenes Zytokin von der Platte gewaschen und gebundenes Zytokin durch einen biotinylierten Detektionsantikörper nachgewiesen. An den Detektionsantikörper wurde Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiertes Streptavidin gekoppelt. Das HRP oxidiert das in der Substratlösung enthaltene ortho-Phenyldiamin (OPD) und führt so zur Bildung eines Farbstoffs. Nach Abstoppen der Reaktion mit 50  $\mu$ l HCl (1 M) wurde die Färbung fotometrisch bei 450 nm (630 nm Referenzfilter) gemessen und die Zytokinkonzentration wurde über eine Standardkurve bestimmt.

Bei den *in vitro*-Versuchen wurde zur Berechnung der Hemmung der Zytokinsekretion die maximale Produktion nach Stimulation gleich 100% gesetzt und entsprechend die Hemmung durch die Zugabe der verschiedenen anti-CD2 mAk berechnet:

$$\% \text{ Hemmung} = 100 - \left[ \frac{(\text{Synthese stimulierter Zellen} + \text{CD2 mAk})}{(\text{Synthese stimulierter Zellen})} \right] \times 100$$

### 3.2.11 Proteinbestimmung nach Bradford (modifiziert)

Die zu untersuchenden Proben wurden 1:2 mit NaCl (0,9%) verdünnt und pro Well wurden 5  $\mu$ l der Verdünnung mit 200  $\mu$ l Bradfordlösung versetzt. Nach einer Inkubation von 5-30 min (RT) wurden die Proben bei 595 nm gemessen. Die Messung erfolgte als Doppelbestimmung. Die Konzentration in den Proben wurde über ein Standardprotein bestimmt.

### **3.2.12            Histologische Untersuchungen & mikroskopisches Scoring**

Nach Tötung der Versuchstiere wurden Proben von terminalem Ileum und Colon entnommen, in 4%igem Formaldehyd fixiert, maschinell entwässert (Hypercenter XP, Thermo Strandon) und in Paraffin eingebettet (Tissue Tek® Dispensing console, Sakura). Es wurden mit einem Mikrotom (HM330, Microm) Schnitte von 5 µm angefertigt. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin/Eosin bzw. mit PAP gefärbt.

Zusätzlich wurden vom entommenen Blut Ausstriche angefertigt und nach Giemsa angefärbt. Es wurden Differential-Blutbilder erstellt und mikroskopisch aufgewertet.

#### **3.2.12.1            *Hämatoxylin/Eosin-Färbung***

Die Paraffinschnitte wurden maschinell entparaffiniert, mit Hämatoxlin/Eosin angefärbt (Varistain 24-4, Strandon) und eingedeckt (Tissue Tek® SCA, Sakura).

#### **3.2.12.2            *Polyklonale Immunperoxidase-Färbung***

Die polyklonale Immunperoxidase-Färbung diente dem histologischen Nachweis von *Toxoplasma gondii* in Gewebeschnitten. Antikörper, Serum und Reagenzien wurden mit modifiziertem PBS (mPBS) verdünnt.

Die entparaffinierten Schnitte wurden zur Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität für 15 min in 3%iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung inkubiert. Nach mehrmaligem Spülen mit Wasser wurden die Schnitte mit mPBS inkubiert (5 min) und anschließende für 30 min mit 1:10 verdünntem Schweineserum vollständig bedeckt. Im nächsten Schritt wurde das Kaninchen-anti-*T.gondii*-Antiserum aufgetragen (1:2000 verdünnt). Die Inkubation der Schnitte erfolgte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer. Die Schnitte wurden mit mPBS gespült und für 5 min inkubiert. Anschließend erfolgte der Auftrag des Sekundäntikörpers (Schwein-anti-Kaninchen-Ig; 1:100 verdünnt, 30 min, RT). Vor und nach der sich anschließenden Inkubation mit (PAP; 1:100 verdünnt, 30 min RT) wurden die Schnitte ebenfalls gespült und 5 min mit mPBS inkubiert.



Die darauffolgende Inkubation mit der Diaminbenzidin (DAB)-Arbeitslösung (2 ml DAB-Lösung + 10 µl 30 %iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) erfolgte für 5 min. Abschließend wurden die Objektträger abgespült (mPBS, A. dest., CuSO<sub>4</sub>-Lösung; jeweils für 5 min, anschließend Spülen mit Wasser), mit Hämatoxylin gegengefärbt und eingedeckt. Zur Auswertung wurden die *T. gondii*-Vakuolen in einem zufällig ausgewählten 1 cm langen Stück distal und proximal mikroskopisch ausgezählt.

### 3.2.12.3 *Giemsa-Färbung von Blutausstrichen*

Die getrockneten Blutausstriche wurden 5 min mit Methanol fixiert und mit Giemsa-Färbelösung (500 µl Giemsalösung auf 19,5 ml Phosphatpuffer) für 15 min gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte mit H<sub>2</sub>O abgespült und mikroskopisch ausgewertet.

### 3.2.12.4 *Mikroskopisches Scoring*

Der Grad der Entzündung (Score) im Dam von Mäusen mit Transfercolitis wurde an Hämatoxylin/Eosin gefärbten Schnitten (5 µm) nach folgendem System mikroskopisch bestimmt.

Modifiziertes Scoringsystem nach Neurath et al.<sup>120</sup>:

- 0 Keine Entzündungszeichen
- 1 Niedrige Infiltration von Entzündungszellen (z.B. Neutrophile)
- 2 Geringe Infiltration von Entzündungszellen
- 3 Hohe Infiltration von Entzündungszellen, hohe vaskuläre Dichte, Darmwandverdickungen
- 4 Transmurale Infiltration von Entzündungszellen, Becherzellverlust, hohe vaskuläre Dichte, starke Darmwandverdickungen, Ulzerationen und/oder Kryptenabszesse

An PAP-gefärbten Darmgewebe-Schnitten der mit *T. gondii* infizierten Mäuse wurde die Zahl der *T. gondii*-Vakuolen pro cm Ileum mikroskopisch ausgezählt. Zusätzlich wurden HE-gefärbte Schnitte histologisch nach folgendem Scoring-System beurteilt:

- 0 Keine Entzündungszeichen
- 1 Ödembildung in den Zotten
- 2 Intaktes Epithel, Transsudat
- 3 Abgabe von Zellen in das Lumen
- 4 Beginnende Auflösung der Epithelschicht
- 5 Vollständige Zerstörung, Nekrose.

### 3.2.12.5 *Makroskopisches Scoring*

Das makroskopische Scoring der Mäusedärme erfolgte ebenfalls nach dem modifizierten Scoringssystem nach Neurath et al. <sup>120</sup>:

- 0 Kein Hinweis auf Entzündung
- 1 Erytheme
- 2 Erytheme, leichte Ödeme, kleine Erosionen
- 3  $\geq 2$  blutende Ulzerationen und/oder Entzündungen, sowie moderate Adhäsionen
- 4 Ernste Ulzerationen und/oder Stenosen mit prästenotischen Dilatationen und/oder ernsthaften Adhäsionen

### 3.2.12.6 *Endoskopisches Scoring*

Zusätzlich wurde bei den CD45RB<sup>high</sup>-Transfercolitis-Mäusen 6 Wochen nach Transfer der Grad der Transfercolitis endoskopisch bestimmt, wie bei Becker et al. beschrieben <sup>121</sup>. Videofilme der Maus-Endoskopie wurden durch einen geübten Gastroenterologen nach folgendem Scoring-System beurteilt:

- 0 Normale mukosale Vaskularität und Lumen
- 1 Verminderte Vaskularität
- 2 Erytheme und Ödeme
- 3 Aufgehobene Vaskularität und kleine Ulzerationen
- 4 Schwere Ulzerationen und Stenosen

### 3.2.13 Typisierung

#### 3.2.13.1 *Durchflusszytometrische Typisierung huCD2tg-Mäuse*

Den zu typisierenden Mäusen wurde aus der Schwanzvene etwa 30 µl Blut entnommen, die Erythrozyten wurden mit 3 ml Lysepuffer lysiert (5 min bei 4°C) und abzentrifugiert (5 min bei 300 g). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 300 µl FACS-Puffer resuspendiert. Die Lymphozyten wurden 20-30 Minuten mit FITC-markiertem anti-human CD2-Antikörper (BD Bioscience) inkubiert (4°C, dunkel), 2 x mit 1 ml PBS gewaschen (3 min, 400g), in 300 µl FACS-Puffer resuspendiert und durchflusszytometrisch wurde die Expression von CD2 bestimmt. Als Kontrolle dienten Wildtyp-Mäuse, die kein humanes CD2 exprimieren.

#### 3.2.13.2 *Genotypisierung CD2 defizienter Mäuse*

Die Isolierung der DNA erfolgte aus Schwanzspitzen und wurde entsprechend dem Protokoll des Herstellers (DNeasy Tissue Kits; Qiagen) durchgeführt. Konzentration und Reinheit der isolierten DNA wurden fotometrisch (260 und 280 nm) bestimmt. Die *in vitro*-Amplifikation von DNA mit einem Reinheitsquotienten zwischen 1,8 und 2,1 erfolgte durch die Polymerase-chain-reaction (PCR). Mit Hilfe der PCR lässt sich ein definierter Proteinsäureabschnitt selektiv vervielfältigen. Grundlage der Reaktion sind zyklische Temperaturänderungen, welche optimale Bedingungen für verschiedene Reaktionen (Auftrennung, Hybridisierung der Primer, Amplifizierung, erneute Auftrennung) schaffen.

Die untenstehende Tabelle (Tab. 3.1) gibt sowohl die Sequenzen der verwendeten Primer als auch den Reaktionsmix und das PCR-Programm wieder.

Tab. 3.1: Typisierung CD2 defizienter Mäuse:

Reaktionsmix (50 µl)	Endkonzentration
10x PCR-Puffer (mit 15 mM MgCl <sub>2</sub> )	1 x; 1,5 mM
10 mM dNTP	je 0,2 mM
CD2F1 (5' TGA AAT GTA AAT TCC TGG GTA GC 3')	0,5 µM
CD2R1 (5' GGG GAT GTT CAG GGT GAT GC 3')	1 µM
Neo (5' AGG ATC TCG TCG TGA CCC ATG GCG A 3')	0,5 µM
N1131AS	0,5 µM
5U/µl Hot Start Taq DNA Polymerase	0,05 U/µl
Template DNA	100 ng

<u>PCR-Programm:</u>	<u>95°C 15 min</u>	<u>1 Zyklus</u>
	94°C 45 sek	
	60°C 1 min	30 Zyklen
	<u>2°C 1 min</u>	
	72°C 5 min	1 Zyklus

Die Auswertung der gewonnenen PCR-Produkte erfolgte mittels Gel-Elektrophorese. Für die Auftrennung der DNA-Fragmente wurde ein 2%iges Agarosegel (+ 10 µL Ethidiumbromid) verwendet. Die PCR-Produkte wurden 1:5 mit Ladepuffer verdünnt, in die Geltaschen pipettiert und bei 80 V Gleichstrom aufgetrennt (ca. 1,5 Stunden). Die Typisierung wurde unter UV-Licht kontrolliert und fotografisch dokumentiert (CD2 defizient: Bande bei 350 bp; Wildtyp: Bande bei 250 bp).

### 3.2.13 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde SPSS für Windows verwendet. Die dargestellten Boxplots beschreiben Median, obere und untere Quartile sowie Maximum und Minimum. Im Text und in den Diagrammen sind Mittelwert (MW) und Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) angegeben. Signifikanzen wurden über den nicht-parametrischen Mann-Whitney-U Test ermittelt. Die U-Statistik gilt dann als signifikant, wenn sich die Mediane mit  $p \leq 0,05$  voneinander unterscheiden. In Streudiagrammen wurden Einzel- und Mittelwerte dargestellt. Überlebenskurven wurden nach Kaplan-Meier-Analyse erstellt.